

Ph.D. értekezés tézisei

Brassinoszteroid-regulált génexpresszió vizsgálata
***Arabidopsis thaliana*-ban**

Írta: Molnár Gergely

Témavezető: Dr. Szekeres Miklós

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Foto- és Kronobiológia Csoport

Szeged
2001

BEVEZETÉS

A magasabbrendű növények élete során lejátszódó növekedési és fejlődési folyamatok összehangolása a sejtek közötti kommunikációnak köszönhető. Azokat az általánosan elterjedt, esszenciális szignál-vegyületeket, amelyek sejtek, szövetek, illetve szervek közti diffúziójuk vagy transzportjuk eredményeként keletkezési helyüktől távolabb fejtik ki hatásukat, összefoglaló nevükön növényi hormonoknak nevezzük.

A hormonok sejtfelszíni vagy intracelluláris receptoraikhoz kötődve, szignál-transzdukciós láncakon keresztül génexpressziós változásokat indukálnak. A gének összehangoltan megváltozott működése komplex változásokat eredményez sejt- és egyedszinten egyaránt. Az így lejátszódó folyamatok igen gyakran több hormon együttes hatásának a következményei. A növényi életfolyamatok megértéséhez elengedhetetlenül fontos a hormonhatások molekuláris mechanizmusának feltérképezése és a szabályozott gének megismerése.

Sokáig úgy vélték, hogy a genetikai program és a környezeti tényezők által meghatározott változások kialakításában öt hormoncsalád játszik szerepet: az auxinok, gibberellinek, citokininek, az abszizinsav és az etilén. Az utóbbi években számos, hormonszerű funkcióval rendelkező molekulát azonosítottak, esszenciális jellegükről azonban nem rendelkezünk elegendő információval. A közelmúlt eredményei szolgáltatnak kétségbevonhatatlan bizonyítékokat arra, hogy a régóta ismert, "klasszikus" hormonokon kívül a magasabbrendű növényekben általánosan elterjedt szteránvázis vegyületcsoport, a brassinoszteroidok is nélkülözhetetlenek a fiziológiai folyamatok megfelelő szabályozásához.

Miközben a brassinoszteroidok élettani hatásait egyre jobban feltérképezik, a hormonok molekuláris hatásmechanizmusa és a közvetítő gének jobbára ismeretlenek maradtak. A reguláció molekuláris hátterének mind pontosabb felderítése számos új információt szolgáltat a növények növekedéséről, fejlődéséről, valamint az élő és élettelen környezeti tényezőkre adott egyéb válaszaikról.

CÉLKITŰZÉS ÉS A DOLGOZAT KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEI

Az évtizedek óta ismert növényi növekedés-serkentő vegyületek, a brassinoszteroidok (BR-ok) kutatásában áttörést jelentett egyes fotomorfogenikus és törpe *Arabidopsis* mutánsok analízise. Fenotípusuk az ismert növényi hormonokkal nem, exogén BR-okkal viszont komplementálható volt. A sérült gének azonosításával és jellemzésével, továbbá analitikai vizsgálatokkal bebizonyosodott, hogy a fejlődési rendellenességek a legnagyobb biológiai hatékonyságú BR, a brasszinolid (BL) hiányára vezethetők vissza. A hormon élettani hatásainak ismerete BR-inszenzitív mutánsok keresésére is lehetőséget teremtett. Ezzel a megközelítéssel azonosítottak egy fehérjét, amelyről feltételezik, hogy az a BR-ok sejtfelszíni receptora, vagy a receptor-komplex egy tagja. A percepciót követő szignál-transzdukciós lépések mindeddig ismeretlenek.

Az élettani hatások az azokat kiváltó hormonok koncentrációjának és egymáshoz viszonyított arányának a függvényei. Így érthető, hogy ezeknek a vegyületeknek a szintézise, lebomlása, és/vagy hozzáférhetősége szigorúan szabályozott. Előzetes vizsgálatokkal kimutatták, hogy a BL-bioszintézisben résztvevő *Arabidopsis CPD* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) gén expresszióját a BL negatívan befolyásolja, lehetőséget teremtve a hormonszintézisnek a rendelkezésre álló aktív végtermék mennyiségétől függő szabályozásához.

A BL hatására bekövetkező élettani változások hátterében álló molekuláris mechanizmusok megértéséhez szükséges a hormon-regulált gének és azok funkciójának ismerete. A dolgozatban bemutatott munka kezdetéig csak néhány sejtfallátrendeződésben szerepet játszó xiloglukán-endotranszglikoziláz génjéről sikerült kimutatni, hogy expressziójukat a BL befolyásolja. Valószínűsíthető volt, hogy ezeknek a géneknek a szabályozott működése a BL-indukált sejtmegnyúlás szükséges, de nem elégséges feltétele. Az utóbbi években néhány egyéb, a megnyúlás, illetve a sejtosztódás egy-egy részfolyamatát meghatározó fehérjét kódoló BL-regulált gént is sikerült azonosítani, a különböző folyamatokat összehangoló faktorok azonban továbbra is ismeretlenek maradtak. A BR-deficiens *Arabidopsis cpd* mutáns lehetőséget kínált a hormonfüggő génexpressziós változások vizsgálatára.

A rendelkezésünkre álló információk alapján munkánk céljául tűztük ki:

- Az *Arabidopsis CPD* gén expressziójának brasszinoszteroid-függő szabályozásában a reguláció módjának és specificitásának felderítését;
- A *CPD* expresszió szerv- és szövet-specifikus, valamint fejlődési stádiumtól függő kifejeződésének meghatározását;
- A brasszinoszteroidok molekuláris hatásainak vizsgálata céljából további BL-reszponzív gének azonosítását és jellemzését.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- A növények kezelése hormonokkal és egyéb vegyületekkel
- Növényi RNS izolálás
- Northern hibridizáció
- GUS hisztokémiai analízis
- Differential display (DDRT-PCR) analízis
- Molekuláris klónozási technikák
- Teljes cDNS klón izolálása
- RT-PCR analízis
- Az *Arabidopsis* virág-transzformációja
- Transzgénikus növények létrehozása és vizsgálata

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. Az előzetes eredmények ismeretében megvizsgáltuk a brasszinolid hatását a BR bioszintézisében szerepet játszó *Arabidopsis* CPD fehérje génjének expressziójára. A CPD promoter funkcionális analíziséhez olyan transzgénikus növényeket használtunk, amelyek egy, a CPD promoter ellenőrzése alatt megnyilvánuló *GUS* riporter gént tartalmaztak. RNS-t izoláltunk 8 napos etiolált, illetve fényben nevelt növényekből, amelyeket különböző ideig brasszinoliddal kezeltünk. Annak megállapításához, hogy a fehérje-szintézis gátlása befolyásolja-e az esetlegesen RNS-szinten bekövetkező hormonválasz kialakulását, a kísérleteket cikloheximid jelenlétében is elvégeztük. Az így izolált RNS mintákat Northern hibridizációs vizsgálatoknak vetettük alá. A transzkripcióra és az mRNA degradációra kifejtett hatások megkülönböztethetővé tétele érdekében mind a *GUS* riporter gént, mind az endogén CPD kódoló szekvenciájának egy-egy darabját párhuzamosan próbaként használtuk.

A fényben nevelt növényekben a CPD transzkriptum mennyisége BL-kezelés hatására két óra elteltével az eredeti szint 10%-ára esik vissza, amely a kezelési időtartam növelésével már nem csökken tovább. A gátló hatás az etiolált növények esetében is megfigyelhető, lefutása azonban némiképp lassabb. A két különböző próbával végzett hibridizációk eredménye szinte teljesen azonos volt, így azt a következtetést vonhattuk le, hogy a hormonhatás legfontosabb szintje a CPD génről képződő RNS mennyiségének szabályozása.

Cikloheximid jelenlétében a hormonhatás elmaradt. A jelenség legvalószínűbb magyarázatának az mutatkozik, hogy a CPD expresszió BL-gátlásához egy, a hormon jelenléte következtében *de novo* szintetizálódó transzkripciós represszorfehérjére, vagy egy jelenlévő transzkripciós faktor aktivitását kovalens modifikációval kialakító protein szintézisére van szükség.

A CPD expresszió negatív visszacsatolós szabályozása lehetőséget teremt a mindenkori hormonszint szabályozására, a hormon-homeosztázis fenntartására. A szabályozási mechanizmus nem egyedi, hasonló jelenséggel találkozhatunk a gibberellinek bioszintézisének egy lépésénél, illetve az állati szteroidok termelődésénél is.

2. A *CPD* expresszió időbeli és térbeli eloszlását a *CPD* promoter-*GUS* konstrukciót hordozó transzgénikus növények *GUS* festésével határoztuk meg. A vizsgálatokhoz különböző korú, fényben vagy sötétben nevelt növényeket használtunk. Fényben nevelt növények esetében a riporter gén expressziójának mértéke közvetlenül a csírázást követően még nem érte el a kimutathatósági küszöböt, a *GUS* aktivitás 3 nap elteltével volt először detektálható. Az aktivitás szinte kizárólag a sziklevelekre korlátozódott, csupán az esetek igen kis részében volt gyenge festődés megfigyelhető a hipokotil legfelső részében. A festődés intenzitása a sziklevel fejlődése során fokozatosan nőtt, majd 10 nap elteltével megjelent a fejlődő levélkezdeményekben. Ezzel egyidőben mértéke a sziklevelekben fokozatos csökkenést mutatott. A riporter gén aktivitása az etiolált növényekben térben és időben megegyezett a fényben tapasztalhatóval. Esetenként alacsony aktivitás volt megfigyelhető a hipokotilkampóban is. Az alkalmazott fényviszonyoktól függetlenül a hipokotil alsóbb régióiban és a gyökérben soha nem tapasztaltunk detektálható *GUS* aktivitást. A növény fejlődésének későbbi szakaszaiban a *GUS* aktivitás a levélrügyekben és a fiatal tőlevelekben volt megfigyelhető, a levéllyegekben viszont nem. A levelek öregedésével a festődés mértéke fokozatosan csökkent és egyre inkább az aktív növekedést mutató levélszélekre szorítkozott. A leveleket tovább vizsgálva kiderült, hogy a festődés a paliszád parenchimára és az adaxiális epidermisz sztóma-zárósejtjeire korlátozódik. A virágtengelyen csak a szárlevelekben és a csészelevelekben mutatkozott aktivitás, a virág más szerveiben viszont nem. A gyökerekben a felnőtt növények vizsgálatakor sem tapasztaltunk detektálható *GUS* aktivitást. A BL jelenlétében nevelt csíranövényekben a *GUS* aktivitás a sziklevelekben a kezeletlen kontrollhoz képest – a Northern hibridizáció eredményeivel összehangban – alacsonyabbnak mutatkozott, számottevő festődés csak a levélkezdeményekben volt látható.

A magasabbrendű növények brasszinoszteroidokban rendkívül gazdag részei a pollen és a magvak, amelyekben *CPD* aktivitás nem figyelhető meg. Ezenkívül mivel a hormon egyik legfontosabb élettani hatása a hipokotil és a szár megnyúlásának serkentése, fel kell tételeznünk, hogy a brasszinoszteroid bioszintézise – legalábbis teljes egészében – nem azokban a megnyúló régiókban következik be, amelyekben a

biológiaiilag aktív hormon jelenléte elengedhetetlenül szükséges, ezért az említett növényi szervezetben bekövetkező változások kiváltásához a végterméknek és/vagy egyes prekursorainak a hatóhelyre történő transzportjára van szükség. A biológiaiilag aktív brasszinolid szintézishelyének megállapításához, a hormon és prekursorai esetleges transzportjának feltérképezéséhez más bioszintetikus- és transzportmutánsok analízisére és más típusú kísérletekre van szükség.

A rendelkezésünkre álló ismeretek alapján világosan látszik, hogy a fiziológiás hormonkoncentráció kialakítása egy komplex szabályozási rendszer működésének eredménye, amelynek elemeit még csak most kezdjük megismerni. A brasszinoszteroidok önmaguk bioszintézisében betöltött regulációs szerepe ennek az összetett mechanizmusnak szükséges, de valószínűleg nem elégséges összetevője.

3. A BR-ok által szabályozott génexpresszió további vizsgálatához az ún. „differential display” módszert választottuk. A kísérletek döntő részét 14 napos homozigóta cpd mutáns *Arabidopsis* növények felhasználásával végeztük. Mivel ismereteink szerint ezekben a növényekben nincsenek biológiaiilag aktív BR-ok, a hormonhatás vizsgálatához optimális rendszert jelentenek. Annak érdekében, hogy olyan folyamatokról nyerjünk információkat, amelyek a BR-ok primer, azaz közvetlen hatásának tulajdoníthatók, tehát kiváltásukhoz elegendőek a sejtekben eleve megtalálható faktorok, a hormonkezeléseket a fehérje-szintézist gátló cikloheximid jelenlétében végeztük.

A módszer segítségével azonosítottunk egy cDNS fragmentumot, amelynek abundanciája BL-kezelés hatására reprodukálható módon csökkenést mutatott. A fragmentum felhasználásával *Arabidopsis* cDNS bankból bakteriofág-hibridizációval izoláltuk a megfelelő teljes hosszúságú cDNS-t. A cDNS hosszúsága 723 bázispár, amely egy 170 aminosav hosszúságú nyílt leolvasási keretet, továbbá egy 20 bázispáros 5'- és egy 190 nukleotida hosszúságú 3'-nem transzlálódó régiót határoz meg. A cDNS-nek megfelelő gén egy kópiás, intronnal nem rendelkezik. Az adatbázis keresések eredménye alapján a prediktált fehérje egy a magasabbrendű élőlények körében elterjedt, ún. RING-H2 finger motívumot tartalmaz. Ez alapján a gént *BRH1*-nek (*Brassinosteroid-Responsive RING-H2*) neveztük el. A *BRH1* mérete és szerkezete alapján az *Arabidopsis*

RING-H2 fehérjék egy csoportját kódoló, ezidáig alig jellemzett ún. *RH* gének *RHA* alcsaládjába sorolható be.

A BL negatívan befolyásolja a *BRH1* gén expresszióját. A gátló hatás mind vad típusban, mind a cpd mutánsban megfigyelhető, kialakulásához nincs szükség *de novo* fehérje-szintézisre. A hormon negatív szabályozó szerepét alátámasztja az a megfigyelés is, hogy az aktív BR-okat nem tartalmazó mutáns növényekben az expresszió alapszintje sokkal magasabb. A tapasztalható mRNS szint-különbségből arra következtetünk, hogy a *BRH1* expresszióra a fiziológiás mennyiségben jelenlévő hormon is hatást gyakorol, tehát a gén megnyilvánulása a növényekben a BL ellenőrzése alatt áll. A maximális gátlás már egy órával a BL hozzáadása után megfigyelhető, mértéke ennél hosszabb kezelésnél sem változik. Mivel adataink alapján a hatás megjelenéséhez szükséges összes faktor a növényekben mindvégig rendelkezésre áll, eredményeink összhangban voltak várakozásainkkal.

A *BRH1* szabályozására több modellt is felállíthatunk. A legegyszerűbbnek egy transzkripció faktor (aktivátor vagy represszor) aktivitásának megváltoztatása tűnik, amit a fehérje egy tulajdonságának (pl. foszforilációs állapot, lokalizáció) megváltozása idéz elő. Ugyanakkor nem zárható ki az a feltételezés sem, hogy a *BRH1* expressziójának regulációja az mRNS BL-függő degradációján keresztül történik. Ennek megállapítása további kísérleteket igényel.

4. Megállapítottuk, hogy a *BRH1* expresszióját más növényi hormonok nem befolyásolják. Így a *BRH1* egyike azon kevés ismert *Arabidopsis* géneknek, amelynek megnyilvánulását a BL specifikusan szabályozza. Az *RH* géncsalád egy másik tagjához (*ATL2*) hasonlóan viszont érdekes módon a gén megnyilvánulását a patogén elicitor kitin serkenti, ezáltal valószínűsíti a BRH1 fehérje szerepét egy stressz-regulált folyamatban is. Az *ATL2*-höz hasonlóan 45 perc elteltével az elicitor hatására növekedés figyelhető meg a *BRH1* expressziójában. Négy órás kezeléssel ez már nem tapasztalható, a mRNS mennyisége a kontrollal megegyező szintre esik vissza. A kitinhatás időbeli lefutása eltér a kontrollként használt bázikus kitináz (*PR-3*) génnél tapasztalhatótól. Pillanatnyi ismereteink szerint a BRH1 az egyedüli olyan *Arabidopsis* gén, amelynek expresszióját a BL és egy stressz-faktor ellentétesen befolyásolja.

5. Annak megállapításához, hogy a BRH1 fehérje jelenléte és mennyisége befolyásolja-e a növények fejlődését és életciklusát, a *BRH1* gént szensz és antiszensz orientációban 35S promoter mögé építettük, majd az ezeket a konstrukciókat hordozó *Agrobacteriumok* felhasználásával stabil transzgénikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre. A *BRH1* mRNS-t túltermelő és csökkent mennyiségben tartalmazó növények fejlődésének korai szakaszában nem láttunk fenotípusos eltérést, a vad típustól eltérő jegyeket csak felnőtt egyedeken tapasztaltunk. A transzgént antiszensz orientációban kifejező és a *BRH1* transzkriptumot csökkent mennyiségben tartalmazó felnőtt növények robusztusabbak a vad típusúaknál. A virágtengely szárleveleinek hónaljrügyeiből nagyobb gyakorisággal jönnek létre járulékos virágszárak. A szárlevelek száma meghaladja a vad típusra jellemzőt, míg a tölevelek számában nem figyelhető meg szignifikáns változás. A növények szára vastag, erőteljes, a tölevelek igen nagyok. A szárlevelek fogazottsága sokkal kifejezettebb. A virágszerkezetben nem tapasztalható eltérés a vad típushoz képest. Annak alapján, hogy az antiszensz növények látható mutáns fenotípussal rendelkeznek, feltételezhetjük, hogy a sejtekben nem áll rendelkezésre más olyan fehérje, amely képes lenne a BRH1 teljes funkcionális pótlására. A szensz konstrukciót hordozó növények fenotípusa megegyezik a vad típusú növényekével. Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy az általunk alkalmazott nevelési körülmények között a BRH1 fehérje megfelelő mennyiségű jelenléte nem létfontosságú a növények számára.

Pillanatnyi ismereteink szerint a RING finger doméneket hordozó fehérjék rendkívül szerteágazó funkciókkal rendelkeznek: részt vehetnek pl. transzkripció, szignál-transzdukciós folyamatokban, organellum-transzportban és -biogenezisben, vagy RNS transzportban is. A különböző sejten belüli szerepek között az egyetlen összekötő kapcsolatot sokáig az a mostanra általánosan elfogadottá vált elmélet jelentette, miszerint a RING motívum kapcsoló szerepet tölthet be különféle fehérjekomplexek kialakításában. A legutóbbi néhány év kutatásaival sikerült kimutatni egyes RING finger fehérjék szerepét az ubiquitinációs folyamatokban, növényekben és állati szervezetekben egyaránt. Az ilyen funkcióval rendelkező RING finger fehérjék nagy hányada RING-H2 domént hordoz. Ugyanakkor az is valószínűsíthető, hogy az ubiquitinációban játszott

szerep nem jellemző ennek az igen nagy fehérjecsaládnak az összes tagjára. A *BRH1* expressziójának ellentétes BR- és elicitor-regulációjából arra következtethetünk, hogy a fehérje nem a pillanatnyilag ismert, egyaránt BR- és elicitor-stimulált, hanem egymást kizáró folyamatokban játszik szerepet. A *BRH1* fehérje pontos funkciójának kiderítéséhez fehérje-szintű vizsgálatokra van szükség.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

(a dolgozathoz felhasznált cikkeket * jelöli)

*Molnár G, Bancos S, Koncz C, Nagy F, Szekeres M (2001) Characterisation of a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, közlésre elfogadva.

*Mathur J, Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, Schell J, Koncz C, Szekeres M (1998) Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* **14**(5):593-602.

Bánfalvi Z, Molnár A, Kostyál Z, Lakatos L, Molnár G (1997) Comparative studies on potato tuber development using an in vitro tuber induction system. *Acta Biol Hung* **48**(1):77-86.

Bánfalvi Z, Molnár A, Molnár G, Lakatos L, Szabó L (1996) Starch synthesis, and tuber storage protein genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and in *Solanum brevidens*. *FEBS Lett* **383**(3):159-64.